MAITRISE DES CORTEGES FLORISTIQUES DE PAILLES DE BLÉ SURINFECTÉES PAR DES BASIDIOMYCETES LIGNINOLYTIQUES

par J. PELHATE* et E. AGOSIN**

RÉSUMÉ. — La présente étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de valorisation des pailles en alimentation animale, par voie biologique, à savoir : l'incubation du substrat, inoculé par huit espèces (basidiomycètes) sélectionnées en fonction de leur activité ligninolytique élevée. Or, cet ensemencement représente une surinfection des pailles préalablement polluées; [redacted] conséquence, la réussite du procédé suppose la maîtrise du cortège floristique mixte avec dominance de l'espèce ligninolytique face aux espèces spontanées pré-installées.

Divers essais ont permis d'évaluer l'aptitude compétitive de quelques basidiomycètes vis-à-vis des espèces les plus représentatives de la flore spontanée. Il s'avère que cette aptitude est régie par le déterminisme écologique (nature et teneur en eau du substrat, pH et température) ou le comportement intrinsèque de chaque espèce.

Les résultats obtenus en simulation du procédé indiquent que l'ensemencement par un inoculum de *Cyathus stercoreus* pré-installé sur paille serait efficace. Cependant, des aménagements techniques s'avèrent nécessaires pour assurer l'implantation des diverses espèces étudiées.

SUMMARY. — The competitive ability of eight lignin-degrading white-rot fungi (basidiomycetes) [redacted] examined in order to evaluate the feasibility of a process concerning the nutritional up-grading of straw by biological delignification. Antagonism of these strains against the most representative species of the flora of straw are studied. Growth characteristics of each fungus are reported.

It appears that the fungi tested were poorly competitive. However, inoculation of unsterile straw with previously colonised straw by the fungus *Cyathus stercoreus* allowed good development of the mycelium. Anyhow, technical devices will be needful to ensure successful colonization of the substrate by white-rot fungi.

MOTS CLÉS : mycoflore des pailles, champignons ligninolytiques, antagonisme fongique, céréales.

* Laboratoire d'Agrobiologie, Faculté des Sciences et Techniques, 6 Avenue Le Gorgeu, 29287 Brest Cedex.

** Laboratoire de Microbiologie, Institut National Agronomique, 9 rue de l'Arbalète, 75231 Paris Cedex 05.

INTRODUCTION

La valorisation des résidus agricoles et agro-alimentaires ■ fait l'objet de nombreuses recherches au cours des dernières années. Plus particulièrement, la meilleure utilisation des pailles de céréales dans l'alimentation des ruminants ■ été envisagée. Ainsi, des pré-traitements chimiques : soude caustique (JACKSON, 1977) et ammoniac (GORDON & CHESSON, 1983) notamment, ou physiques (FAHN & al., 1982) ont été étudiés.

La mise en œuvre de procédés biologiques, en alternative à ces traitements, prend, de nos jours, de plus en plus d'ampleur. Les champignons dits de pourriture blanche (basidiomycètes), contrairement à ceux de pourritures brunes ou molles, sont capables de dégrader les trois principaux constituants des lignocelluloses, à savoir : hémicelluloses, cellulose et lignines; ils s'avèrent dès lors très intéressants. En effet, leur croissance sur bois (KIRK & MOORE, 1972; READE & Mc QUEEN, 1983; ZADRAZIL & al., 1982) ou sur paille de blé (ZADRAZIL & BRUNNERT, 1982; AGOSIN & ODIER, 1985) ou sur divers résidus lignocellulosiques (ZADRAZIL, 1980) de faible valeur alimentaire. . . entraîne une augmentation notable de leur digestibilité atteignant rapidement celle d'un bon foin de prairie (60-70 %). Cependant, le caractère oxydatif du système ligninolytique (BAR-LEV & KIRK, 1981) implique que le procédé soit réalisé en milieu aérobie.

Par ailleurs, l'application du procédé à l'échelle de l'exploitation agricole ne pourra se révéler efficace que si le cortège floristique peut être maîtrisé à l'avantage des espèces ligninolytiques introduites et superposées à la flore spontanée pré-établie.

La mycoflore spontanée des pailles a été étudiée anterieurement afin de sélectionner les espèces les plus représentatives du cortège floristique (PELHATE & AGOSIN, 1985)

En la présente étude, l'aptitude compétitive de sept basidiomycètes particulièrement ligninolytiques (AGOSIN & al., 1985a) est testée vis-à-vi■ de ces espèces spontanées, pré-établies. Pour ce faire, divers essais sont mis en œuvre, depuis l'expérimentation analytique précisant le déterminisme factoriel (tant pour les espèces spontanées qu'introduites) jusqu'à l'approche concrète de l'incubation des pailles inoculées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. – CHOIX DES ESPECES SOUMISES A L'EXPÉRIMENTATION

Flore spontanée :

Pour les essais analytiques – et notamment les confrontations binaires – nous avons retenu les espèces particulièrement fréquentes (PELHATE & AGOSIN,

1985) et présumées les plus actives dans les conditions de l'essai pratique :

Alternaria tenuissima (Fr.) Wiltshire et *Epicoccum nigrum* Link, représentants majeurs de la flore du champ.

Mucor circinelloides van Tiegh. f. *griseo-cyanus* Schipper et *Mucor hiemalis* Wehmer, espèces dites intermédiaires, souvent associées et susceptibles de dominance dans les cortèges, en raison de leur grande luxuriance.

Geotrichum candidum Link, élément fréquent sur substrats humides, semi-confinés et éventuellement «échauffés».

Aspergillus candidus Link, *Aspergillus flavus* Link et *Aspergillus fumigatus* Fres., agents d'altération thermopréférants et dont l'intervention est toujours redoutée sur denrées alimentaires.

Penicillium cyclopium Westl., espèce mésophile des plus cosmopolites.

Penicillium roqueforti Thom, espèce écologiquement voisine mais à impact plus restreint sur les substrats semi-confinés.

Ces divers micromycètes se rangent dans les Hyphomycètes à l'exception des deux Mucorales (Zygomycètes).

Erwinia herbicola (Geil.) Dye, bactérie à très large répartition sur les matières organiques humides, et capable, par multiplication active, d'antagonisme marqué vis-à-vis des espèces fongiques (TEMPE & LIMONARD, 1973).

Espèces ligninolytiques :

Un certain nombre de souches ont été retenues parmi 75 espèces, agents de pourriture blanche, testées sur paille de blé marquée au C^{14} spécifiquement sur la fraction lignine (AGOSIN & al., 1985a).

Elles impliquent les espèces suivantes :

Bjerkandera adusta (Wild. ex Fr.) Karst. / C.B.S. 595.79, espèce mésophile, très luxuriante; souche très sélective des lignines.

Cyathus stercoreus (Schw.) de Toni / N.R.R.L. 6473, espèce mésophile, décrite comme colonisatrice tardive de bouse de vache (WICKLOW & al., 1980); seule souche isolée de «fourrages», les autres provenant, pour la plupart, de bois en décomposition. Activité cellulolytique faible mais dégradation importante des lignines et des hémicelluloses (AGOSIN & al., 1985b).

Dichomitus squalens (Karst.) Reid / C.B.S. 432.34, espèce mésophile responsable d'une minéralisation rapide et élevée des lignines de paille de blé.

Notons que ces 2 dernières espèces, *Cyathus stercoreus* et *Dichomitus squalens*, provoquent la plus forte amélioration de la digestibilité de la paille après fermentation.

Pycnoporus cinnabarinus Karst. / C.B.S. 311.33, se caractérise par une spécificité marquée vis-à-vis des lignines (ANDER & ERIKSSON, 1977).

Pleurotus cornucopiae (Paul ex Pers.) Rolland / C.B.S. 383.80.

Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.) Kummer / C.B.S: 342.69.

Deux espèces à activités ligninolytiques particulièrement élevées sur blé-C^{14}

lignine (AGOSIN & al., 1985a); avec, de plus, une importante aptitude à améliorer la digestibilité (ZADRAZIL, 1980).

Vararia effuscata (Cke & Ell) Rogers & Jackson / S 408, à croissance notable aux températures moyennes.

Sporotrichum pulverulentum Novobranova / A.T.C.C. 32629, espèce thermopréférante, à activité ligninolytique très élevée mais très peu spécifique. Adoptée pour référence, la souche a l'avantage de sporuler abondamment et de différencier des chlamydospores.

Toutes ces espèces appartiennent aux basidiomycètes, Aphyllophorales pour la plupart (AINSWORTH & al., 1973; ARX, 1974); et, en ce qui concerne *Sporotrichum pulverulentum*, il a été montré que la souche représente une forme anamorphe de *Phanerochaete chrysosporium* (BURSDALL & ESLYN, 1974).

2. – CONTROLES DE CROISSANCE *IN VITRO*

Milieux de culture :

Le substrat usuel est l'extrait de malt (2 %) gélosé auquel il peut être ajouté des quantités variables de NaCl pour y modifier l'activité de l'eau.

Le pH, dont on connaît l'incidence particulière sur les processus enzymatiques, a été diversement ajusté (adjonction de soude 100 mM) ou tamponné (6,5 par le phosphate monopotassique 20 mM; 5,5 par le diméthylsuccinate de sodium 20 mM).

Le pH est mesuré (pH mètre Tacussel) après 2 heures de macération dans 20 ml d'eau stérile à 6-8°C, d'un fragment de milieu gélosé (environ 2 cm^2) prélevé sous le thalle et débarrassé de celui-ci.

Incubation :

Une gamme de températures conduit à l'élaboration de courbes spécifiques en transcrivant, pour chaque condition, le taux de croissance linéaire.

3. – TESTS DE COMPÉTITION SUR FRAGMENTS DE CHAUMES

Les espèces sont confrontées deux à deux, à savoir : une espèce spontanée et une espèce réputée ligninolytique. Après diverses tentatives reprenant des techniques antérieurement définies (PELHATE, 1968a), le procédé suivant s'est révélé le plus adéquat :

En boîtes de Pétri maintenues en atmosphère saturée d'eau, sur milieu nutritif (malt 2 %) gélosé, dissocié en 2 plaques, les inoculums respectifs sont déposés simultanément ou non : ensemencements massifs de thalles, en 3 points alignés (Fig. 1). Les deux partenaires colonisant d'abord leur propre substrat nutritif, devront s'affronter au niveau de «passerelles» consistant en des fragments de paille : 5 cm de long et coupés longitudinalement, prélevés sur les entrenœuds

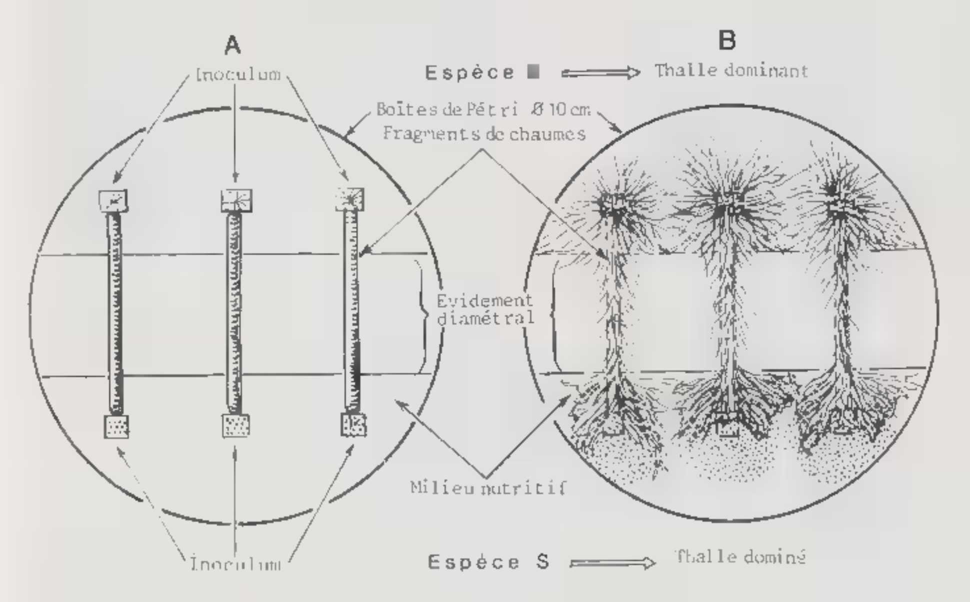


Fig. 1 – Confrontations binaires d'espèces (dispositif expérimental)
A. Ensemencement; B. Essor relatif des deux partenaires : exemple de dominance de l'espèce basidiomycète (B) par recouvrement de l'espèce spontanée (S).

Fig. 1 – Technique employed for assessing the competitive ability of white-rot fungi against natural straw-inhabiting fungi.
A. Inoculation; B. Example of dominance of the white-rot fungus (B) by recovering the antagonist (S).

de chaumes et stérilisés (2 autoclavages de 20 mn à 120°C, à 12 h d'intervalle); divers cas de figure, expressions des aptitudes compétitives, sont alors codifiés.

4. – CULTURES MIXTES SUR PAILLE BROYÉE

Le procédé d'incubation projeté à grande échelle est simulé au laboratoire, sur paille finement broyée (grille de 40 mesh).

5 g de paille de blé (*Triticum aestivum* var. Champlein) sont pesés sous hotte à flux laminaire dans des fioles coniques stériles de 500 ml; l'épaisseur du substrat y est alors de 1 à 3 mm afin de favoriser les échanges gazeux entre la paille et l'atmosphère. Pour la même raison, les fioles sont fermées avec du coton stérile.

Trois types d'essais sont réalisés :

+ **Développement de la flore spontanée** :

Le développement de la flore spontanée est étudié après humidification de la paille par des quantités variables d'eau permutée stérile selon l'humidité finale recherchée (exprimée en % de matière sèche). Les fioles sont incubées, après

homogénéisation avec une baguette de verre stérile, respectivement à 25, 30 et 37 °C, à l'abri de la lumière. Les étuves sont maintenues humides à l'aide d'un bac d'eau afin d'éviter le dessèchement des cultures (contrôlé par pesée journalière). Après 5 jours d'incubation, la flore est analysée selon les deux techniques antérieurement définies pour les inventaires systématiques (PELHATE & AGOSIN, 1985), soit : méthode «qualitative», par ensemencements directs de particules et méthode «quantitative» par numération de «germes» après dilutions décimales en série des suspensions, puis ensemencement et incubation à 22 et 32°C.

+ **Ensemencement direct des espèces ligninolytiques** :

Les cultures sont conduites comme ci-dessus mais, avec l'eau, est introduit l'inoculum à raison de 0,2 % (poids de mycélium/poids de paille sèche). Après 8 jours d'incubation, la flore présente est contrôlée.

+ **Ensemencement en deux temps (avec un «pied-de-cuve»)**

L'implantation des espèces ligninolytiques sur paille non stérile, s'effectue alors par inoculum constitué de paille préalablement colonisée par ces espèces. La souche à étudier est inoculée (à raison de 0,01 %) sur 5 g de paille de blé stérile humidifiée (25 % de matière sèche). Les fioles sont fermées par des têtes de barbottage spécialement adaptées, puis incubées à température optimale de croissance de la souche considérée. Périodiquement, l'atmosphère des cultures est renouvelée par balayage avec un air dépourvu de CO_2. Le CO_2 libéré par la croissance est déterminé après piégeage dans 15 ml de NaOH 2N (AGOSIN & ODIER, 1985).

Après décomposition de la matière sèche jusqu'à 15 % (appréciée par le % de minéralisation du carbone initial présent), environ 600 mg de substrat sont prélevés stérilement pour ensemencer 5 g de paille non stérile, humidifiée. Après homogénéisation, les fioles sont incubées pendant 8 jours puis la flore est analysée comme ci-dessus.

Le pH initial des cultures est ajusté à 6,5 ou 5,5 à l'aide d'une solution stérile à 50 mM de diméthylsuccinate de sodium (Ega) ajoutée au lieu d'eau stérile.

L'inoculum consiste en 3,3 g de paille colonisée pour 100 g de paille (poids sec).

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

1. – CARACTÉRISTIQUES CULTURALES DES ESPECES SPONTANÉES ET LIGNINOLYTIQUES

+ **Déteminisme écologique de la croissance *in vitro***

Les figures 2A, 2B et 3 expriment les croissances relatives en fonction du substrat (pression osmotique et activité de l'eau régies par addition ou non de

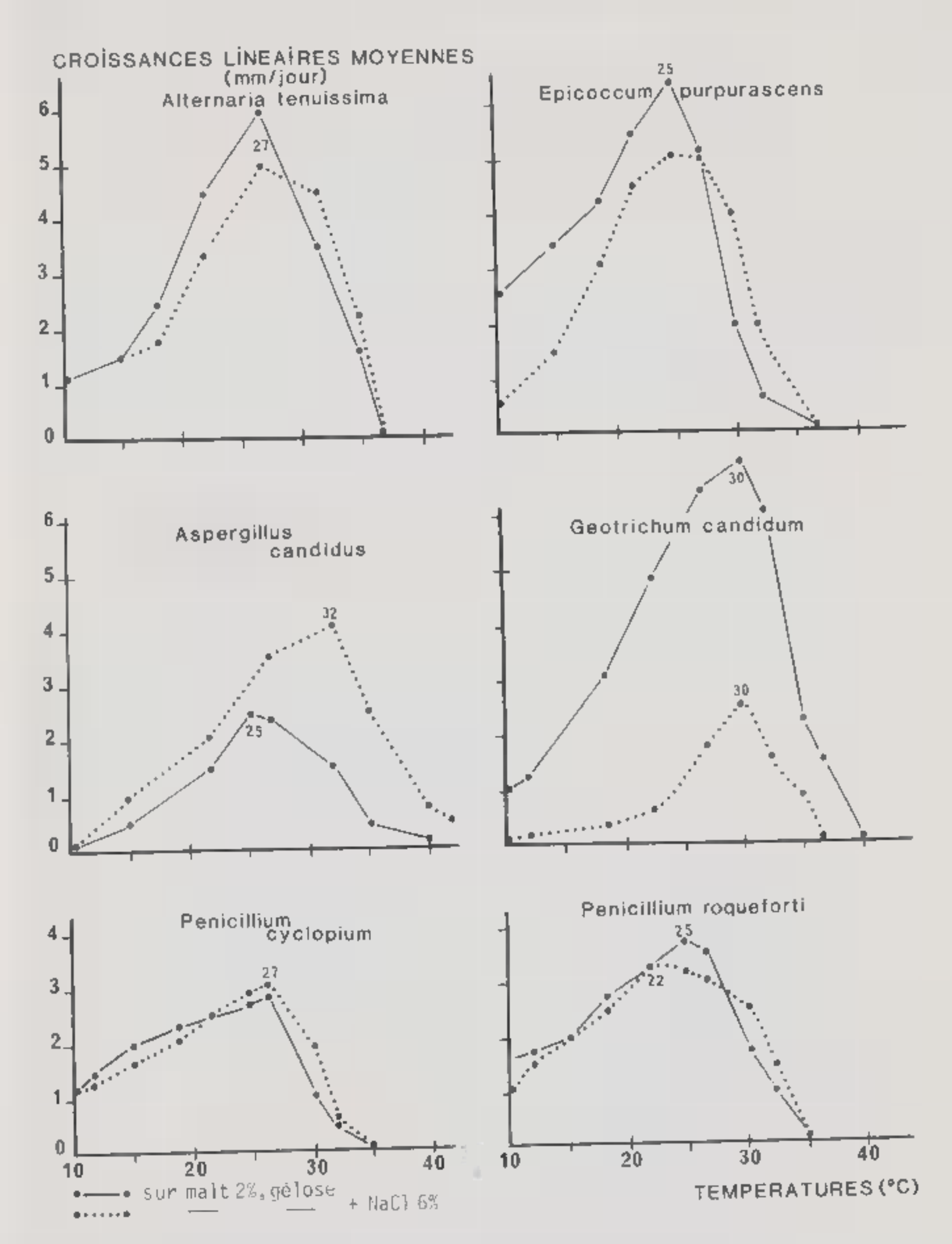


Fig. 2A – Courbes de croissance d'espèces spontanées des pailles.
La croissance linéaire est appréciée en fonction de la température sur milieu de base (Malt 2 % gélosé) additionné ou non de NaCl.

Fig. 2A – Growth rate of various spontaneous straw species.
Linear growth is tested on 2 % Malt agar containing or not NaCl with respect to temperature.

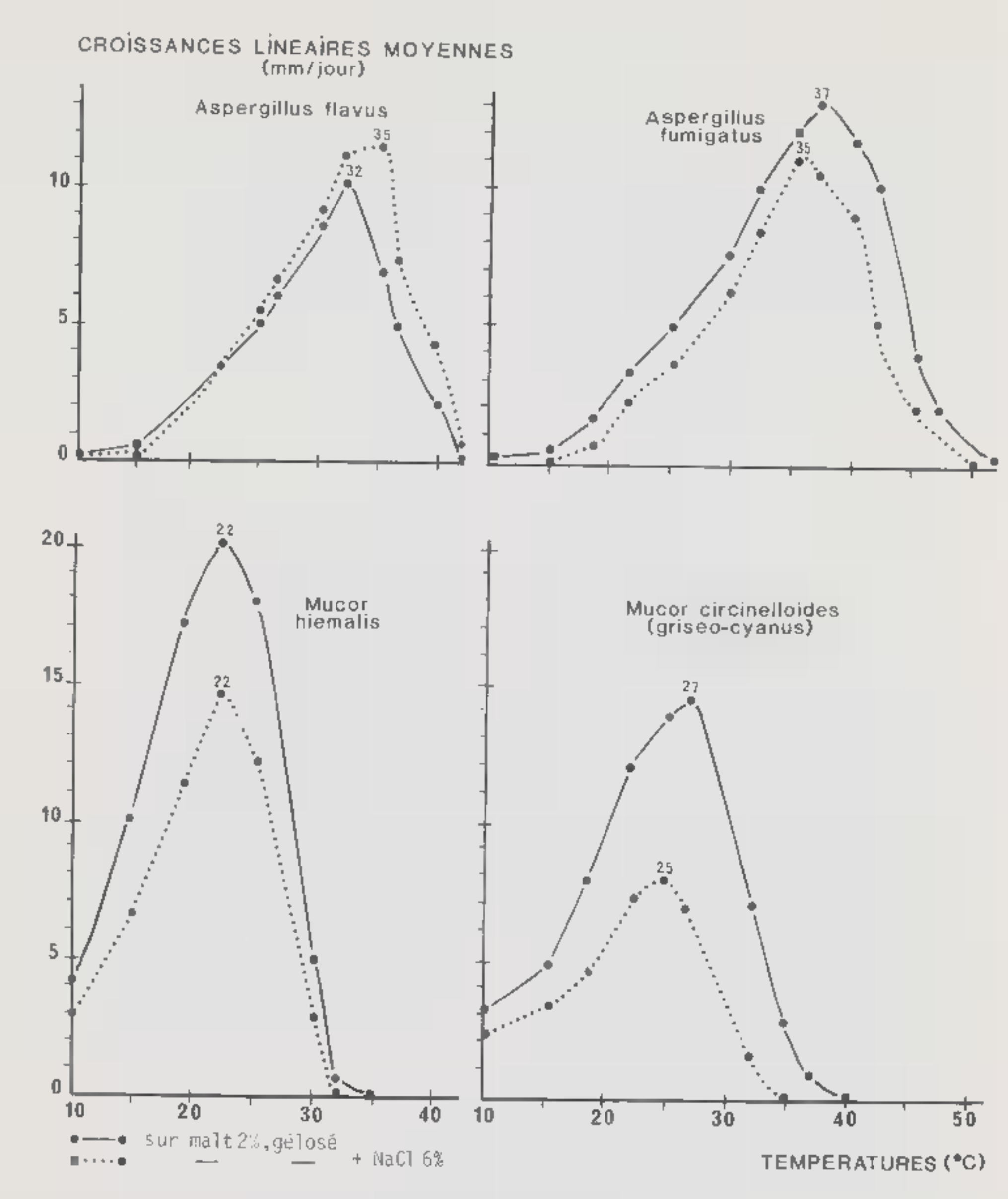


Fig. 2B – Courbes de croissance d'espèces spontanées (suite)
Voir légende de la Fig. 2A.

Fig. 2B – Growth rate of various spontaneous straw species (continuation).
See notice of the Fig. 2A.

Fig. 3 – Courbes de croissance d'espèces ligninolytiques.
La croissance linéaire est appréciée sur 3 milieux distincts (par adjonction, à dose variable, de NaCl) et en fonction de la température.

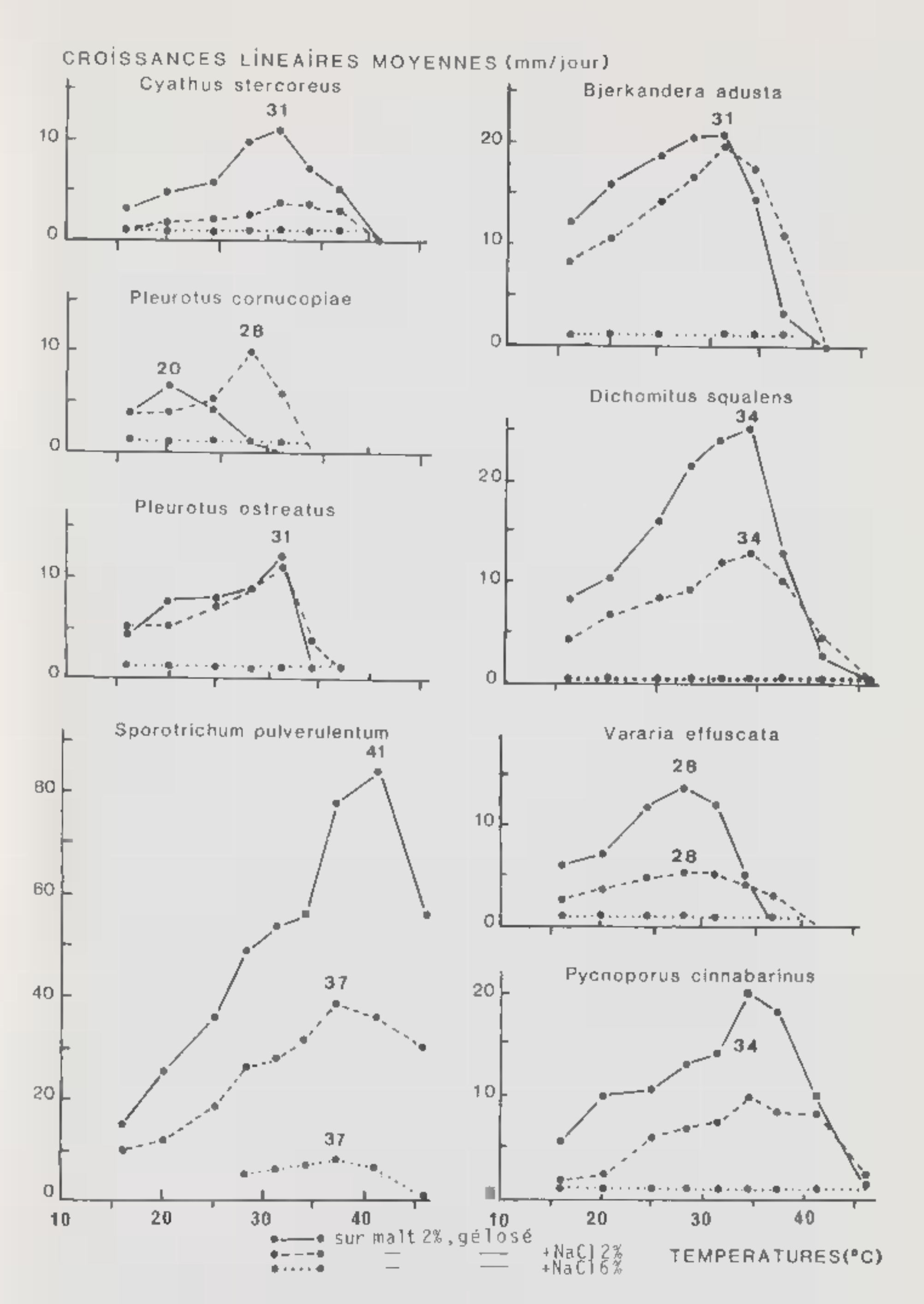


Fig. 3 – Growth rate of white-rot fungi.

Linear growth is tested on malt agar progressively enriched in NaCl, with respect to temperature.

NaCl) et en fonction de la température.

— Activité de l'eau

Du point de vue des besoins en eau :

- les espèces spontanées (Fig. 2A, 2B) se révèlent essentiellement hygrophiles, avec un optimum absolu de croissance sur le milieu de base réalisant la saturation en eau (PELHATE, 1968b); toutefois, les *Aspergillus candidus*, *A. flavus* et, à un degré moindre, *Penicillium cyclopium*, s'avèrent mésophiles et nettement osmophiles (PUGH, 1974).

- les espèces ligninolytiques (Fig. 3) présentent encore davantage la tendance hygrophile puisque, seul, *Pleurotus cornucopiae* présente un maximum en présence de NaCl à 2 % atténuant quelque peu l'activité de l'eau. Mais, aucune des espèces étudiées ne se développe sur malt additionné de 6 % de NaCl. Cette faible tolérance des basidiomycètes aux bas potentiels hydriques, par rapport aux moisissures cosmopolites, a d'ailleurs été signalée (BODDY, 1983).

— Température

Du point de vue thermique, et selon les conventions admises (APINIS, 1971; COONEY & EMERSON, 1964) :

- les espèces spontanées seront qualifiées de mésophiles pour la plupart, leur optimum de croissance se situant aux environs de 25 à 30°C et leur seuil maximal vers 40°C; mais *A. candidus* présente une certaine thermotolérance (notamment sur milieu salé) tandis que *A. flavus* introduit le caractère thermophile psychrotolérant mieux illustré par *A. fumigatus* dont le seuil maximal dépasse les 50°C. Les *Penicillium* spp. sont mésophiles mais fortement psychrotolérants.

- les espèces ligninolytiques sont mieux partagées entre mésophiles (*Bjerkandera adusta*, *Pleurotus cornucopiae* et *P. ostreatus* et *Vararia effuscata*), thermotolérantes (*Dichomitus squalens*, *Pycnoporus cinnabarinus*) et thermophiles psychrotolérantes (*Sporotrichum pulverulentum*).

Il convient enfin de noter l'interférence des paramètres eau et température se traduisant par les décalages des températures cardinales avec accroissement de l'optimum thermique (*A. candidus* plus thermotolérant quand l'activité de l'eau décroît) ou du seuil maximal (*G. candidum*, *A. fumigatus*, *M. circinelloides* dont le caractère hygrophile se trouve confirmé).

— pH

Les comportements d'espèces sont traduits sur les tableaux 1 et 2. Notons d'abord que le pH 6.5 a été choisi comme étant caractéristique des pailles naturelles tandis que le pH 5,5 permet, *a priori*, le développement optimal des espèces ligninolytiques; précisément, les valeurs spécifiques sont comprises entre 4.5 et 5,7 (AGOSIN & al. 1985b). De plus, un pH relativement faible devrait limiter le développement redouté des bactéries.

En considérant d'abord les ajustements de pH sur milieu non tamponné (initialement 6,5), il apparaît une diversité de comportements chez les espèces spontanées, comme observé antérieurement (PANASENKO, 1967; PELHATE,

température pH initial Espèces	25°C 6,5	 5,5	 6,5	30°C 6,5	 5,5	 6,5
Alternaria tenuissima	4,5 5,9	5,5 5,4	5,2 5,5	3,7 5,8	5,0 5,1	5,0 6,1
Epicoccum nigrum	2,5 6,6	4,0 5,5	4,7 5,1	0,5 6,5	1,2 5,3	2,5 5,9
Geotrichum candidum	5,5 6,2	6,0 5,6	6,7 6,2	6,5 6,6	7,0 5,7	7,5 6,1
Mucor circinelloides (griseo-cyanus)	7,5 6,3	12,0 5,2	11,2 4,4	4,5 6,6	13,5 5,3	10,5 4,7
Mucor hiemalis	19,5 6,4	18,2 4,8	14,0 4,3	16,2 6,5	17,5 5,1	13,5 4,6
Aspergillus candidus	3,2 5,9	2,5 5,5	3,0 5,2	3,7 6,4	3,0 4,4	3,2 5,2
Aspergillus flavus	7,5 6,1	8,5 4,8	6,2 4,4	8,7 6,3	9,5 4,5	7,5 4,1
Aspergillus fumigatus	7,5 5,9	8,7 4,8	6,5 4,6	8,0 5,9	10,5 5,4	8,2 4,4
Penicillium cyclopium	2,2 5,7	1,7 4,5	2,0 4,1	2,5 5,9	2,0 4,3	2,0 4,6
Penicillium roqueforti	2,6 6,1	2,6 5,5	2,4 5,1	3,2 5,8	3,0 5,4	2,7 4,2

Tableau 1 — Effet du pH sur la croissance des espèces spontanées.

Essai réalisé à 2 températures (25 et 30°C) sur extrait de malt (2 %) gélosé, aux pH initiaux définis comme suit : 6,5 tamponné au phosphate monopotassique 20 mM; 5,5 tamponné au diméthyl succinate de sodium 20 mM; 6,5 ajusté à la soude 100 mM.

Lire, pour chaque espèce : les croissances moyennes (3 répétitions) exprimées en mm/jour (1ère ligne), les valeurs de pH ajustées en phase exponentielle de croissance optimale (2ème ligne).

Table 1 — Influence of pH on the growth rate of various straw-inhabiting fungi.

Test is carried out at 25° and 30°C on 2 % Malt agar plates; pH were as followed : 6,5 buffered with potassium phosphate 20 mM; 5,5 buffered with sodium dimethyl succinate 20 mM; 6,5 ajusted with sodium hydroxide 100 mM.

For each species, the first line of the table indicates growth rate (mm/day) and the second line pH of the agar plate after colonization by mycelium. Each value is the mean of three replicates.

1974). Ainsi, les espèces du champ (*Alternaria tenuissima* et *Epicoccum nigrum*) et *Geotrichum candidum* déterminent des valeurs comprises entre 5 et 6, les Mucorales environ 4,5, les espèces dites de stockage (*Aspergillus* spp. et *Peni-*

Espèces / température / pH initial	25°C <u>6,5</u>	<u>5,5</u>	6,5	35°C <u>6,5</u>	<u>5,5</u>	6,5
Bjerkandera adusta	6,8 5,7	12,2 5,3	12,7 5,4	5,5 6,1	14,2 5,4	11,6 5,6
Cyathus stercoreus	0 6,6	4,7 5,2	3,6 5,1	ε 6,5	5,1 5,2	4,2 5,0
Dichomitus squalens	0 6,6	6,2 5,2	8,6 5,1	ε 6,5	8,2 5,2	9,5 5,0
Pycnoporus cinnabarinus	2,0 5,8	8,2 4,6	8,5 4,9	2,2 5,8	9,5 4,5	10,7 4,7
Pleurotus cornucopiae	2,5 4,6	5,7 4,1	6,2 5,3	2,6 5,6	6,0 5,1	6,2 5,4
Pleurotus ostreatus	4,2 6,1	6,4 5,2	5,5 5,6	3,5 5,9	6,2 4,7	5,5 5,1
Vararia effuscata	ε 5,9	6,5 5,1	7,2 5,4	0 6,2	7,2 5,4	7,5 5,1
Sporotrichum pulverulentum	ε 6,3	16,5 5,3	14,7 5,1	ε 6,1	23,7 5,4	21,5 4,7

Tableau 2 – Effet du pH sur la croissance des espèces ligninolytiques.
Voir légende du Tableau 1.

Table 2 – Influence of pH on the growth rate of various ligninolytic white-rot fungi.
See notice of Table 1.

cillium spp.) des valeurs encore plus faibles (en considérant bien la température la plus favorable à la croissance). C'est dire que ces chiffres n'ont qu'une valeur relative, le pH fluctuant avec les autres paramètres écologiques dont la température, la nature du substrat...

Sur ce même milieu tamponné, les pH modifiés par les espèces ligninolytiques restent relativement élevés : supérieurs à 5 sauf exception (*Pycnoporus cinnabarinus*) et pour les deux températures; le comportement de ces espèces rappelle donc celui des espèces spontanées dites «du champ».

Si l'on considère ensuite les comportements d'espèces sur les deux milieux tamponnés respectivement aux valeurs de 6,5 et 5,5, une différence essentielle apparaît entre espèces spontanées très tolérantes et espèces ligninolytiques à moindre amplitude. Ainsi, plus de 50 % de ces dernières annulent pratiquement leur croissance à pH 6,5 : les autres accusent aussi une importante régression. La valeur de 5,5 ne semble pas éloignée de l'optimum requis par les différentes espèces, à l'exception des spontanées de stockage plus acidophiles.

En conclusion, si les ajustements de pH spécifiques diffèrent plus pour les espèces spontanées que pour les Basidiomycètes ligninolytiques, l'amplitude

écologique des premières ne permettra guère de les différencier des secondes puis de les dissocier. En outre, l'activité ligninolytique maximale, déterminée pour *Phanerochaete chrysosporium*, correspond à des pH compris entre 4,0 et 4,5 (KIRK & al., 1978); et l'on remarque plus généralement que, très vite après l'implantation du mycélium, le pH des cultures chute à des valeurs comprises entre 4,1 et 4,5 (ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981, 1982; AGOSIN & ODIER, 1985).

+ **Aptitude compétitive des espèces [redacted] confrontations binaires**

Les tableaux 3A, 3B, 3C rendent compte d'essais effectués respectivement à 25, 30 et 35°C; ils traduisent, par notations conventionnelles, les aspects graduels de l'antagonisme entre les espèces ligninolytiques confrontées avec chaque espèce spontanée. Les rapports de «force» sont définis, pour chaque espèce ligninolytique, de la façon suivante :

- la dominance conduit, tôt ou tard, à la destitution du partenaire spontané par lyse plus ou moins active (notations ++ ou +);

- le recouvrement superficiel ou l'intrication des deux thalles opposés (notation (+)) ne préjugent pas toujours de la supériorité de l'un ou de l'autre partenaire; ces cas appellent, en conséquence, des observations prolongées avec contrôles périodiques de survie;

- la co-existence «pacifique» et stationnaire (notation ±) peut se prolonger comme dans le cas de simple contact, sans préjudice mutuel apparent (notation 0);

- la dominance inversée (notation ⊕) correspond au recouvrement ultime par l'espèce spontanée.

Dans le premier essai, à 25°C (Tab. 3A), l'ensemencement simultané de deux partenaires égalise les chances dans la compétition. On explique alors facilement les cas de dominance des basidiomycètes vis-à-vis d'espèces spontanées à vitesse de croissance moindre (*A. candidus*) ou à démarrage lent (*G. candidum*). Les textures respectives de thalles régissent aussi les rapports mutuels : ainsi les mycéliums extensifs, aériens recouvrent-ils les plus restreints de type sporulé (*P. roqueforti*) ou bien s'intriquent-ils au partenaire de même type (*A. tenuissima* et *E. nigrum*, *Mucor* spp.).

En réalité, le dénouement de la compétition peut être influencé par le jeu de paramètres à effets différentiels chez les partenaires (cf. essais suivants); et l'on peut supposer une intéressante corrélation entre l'activité enzymatique des espèces (et des basidiomycètes en particulier) et l'aptitude à coloniser le substrat, garante elle-même de compétitivité (BELL, 1974; GARRETT, 1975).

Pourtant, certaines espèces spontanées à croissance limitée (thalle sporulé de *P. cyclopium*, colonie d'*Erwinia herbicola*) opposent une résistance marquée à la plupart des espèces basidiomycètes; alors, faut-il, sans doute, invoquer une aptitude compétitive spécifique (PELHATE, 1968a; TEMPE & LIMONARD, 1973; WICKLOW & HIRSCHFIELD, 1979).

Espèces spontanées / ligninolytiques	*Alternaria tenuissima*	*Epicoccum nigrum*	*Geotrichum candidum*	*Mucor circinelloides (griseo-cyanus)*	*Mucor hiemalis*	*Aspergillus candidus*	*Aspergillus flavus*	*Aspergillus fumigatus*	*Penicillium cyclopium*	*Penicillium roqueforti*	Bactérie: *Erwinia herbicola*
Bjerkandera adusta	+	(+)r	++	(+)I	(+)I	++	(+)I	(+)R	(+)R	+	(+)r
Cyathus stercoreus	+	0	++	±	±	+	(+)R	(+)R	(+)r	(+)R	(+)r
Dichomitus squalens	++	(+)r	++	±	±	++	0	(+)r	0	(+)r	(+)rr
Pycnoporus cinnabarinus	±	(+)rr	++	±	0	+	(+)rr	0	(+)rr	(+)r	(+)r
Pleurotus cornucopiae	++	(+)R	++	⊕	⊕	+	0	⊕	0	0	■
Pleurotus ostreatus	±	(+)rr	++	(+)r	■	++	(+)R	(+)R	+	+	0
Vararia effuscata	++	(+)R	++	+	±	++	(+)r	(+)rr	0	(+)R	(+)r
Sporotrichum pulverulentum	(+)R	0	+	(+)r	(+)i	++	0	(+)r	(+)r	(+)rr	+

Tableau 3A – Aptitude compétitive des espèces ligninolytiques confrontées aux espèces spontanées, à 25°C.

Degrés de compétitivité des espèces ligninolytiques :

++ Dominance affirmée par recouvrement rapide (< 2 semaines)
\+ Dominance par recouvrement progressif (> 2 semaines)
(+) Compétitivité faible avec lente progression par :
recouvrement extensif : (+)R ou partiel : (+)r ou très limité : (+) rr
ou intrication généralisée : (+)I ou limitée : (+)i ou très limitée : (+)ii
± Intrication des 2 partenaires sans dominance nette de l'un ou de l'autre (survie > 2 mois)
0 : Pas de dominance mais simple contact des 2 thalles
⊕ : Inversion de dominance (à l'avantage de l'espèce spontanée)

Table 3A – Competitive hierarchy among ligninolytic white-rot fungi and various straw-inhabiting fungi, at 25°C.

Evaluation of the decreasing strength of antagonism of ligninolytic species :

++ Strong dominance : the white-rot fungus recovers the antagonist (< 2 weeks)
\+ Dominance : the white-rot fungus progressively recovers the antagonist (> 2 weeks)
(+) Weak competitive ability : low progression with extensive (+)R, or partial (+)r, or very limited (+)rr recovering;
or low progression with extensive (+)I, partial (+)i or very limited (+)ii intermingling
± Mutual intermingling of the 2 organisms
0 Mutual inhibition on contact
⊕ Dominande by the antagonist.

Le deuxième essai (Tab. 3B) est réalisé à 30°C en vue de favoriser les espèces ligninolytiques qui réalisent, à cette température, une croissance quasiment optimale. En dépit de ces conditions :

– *Bjerkandera adusta* ne se révèle guère plus compétitif qu'à 25°C. On remarquera notamment l'antagonisme accru de l'*A. flavus* qui profite mieux de l'accroissement de température (optimum thermique voisin de 35°C) et même de l'*A. tenuissima* simplement intriqué et non plus recouvert. Les comportements vis-à-vis d'*E. nigrum* (recouvrement limité) ou des *Mucor* spp. (intrication) restent pour ainsi dire inchangés.

– *Cyathus stercoreus* se comporte moins bien, face à l'antagonisme strict d'*E. nigrum*, aux intrications de *Mucor* spp. ou à la compétition accentuée des thermopréférants (*A. flavus* et *A. fumigatus*) et même des *Penicillium* spp. mésophiles.

– *Dichomitus squalens* ne surpasse pas l'antagonisme très spécifique d'*A. flavus* mais partiellement celui de *P. cyclopium* (optimum thermique de 27°C); les deux *Mucor* spp. sont aussi bien dominés (températures optimales respectives de 27°C pour *M. circinelloides* et 22°C pour *M. hiemalis*); il en est de même de la bactérie.

– *Pycnoporus cinnabarinus*, plus actif vis-à-vis d'*E. nigrum*, de *Mucor hiemalis* et de la bactérie, l'est moins par rapport à *A. flavus* et *A. fumigatus*, thermopréférants qui s'affirment en inversant la dominance à leur avantage.

– *Sporotrichum pulverulentum* devient plus compétitif vis-à-vis d'*E. nigrum*, des deux *Mucor* spp. ou de la bactérie mais non pas par rapport à *A. flavus* qui représente ainsi une menace dans les cortèges floristiques en inversant encore la dominance.

Espèces spontanées / ligninolytiques	*Alternaria tenuissima*	*Epicoccum nigrum*	*Geotrichum candidum*	*Mucor circinelloides (griseo-cyanus)*	*Mucor hiemalis*	*Aspergillus candidus*	*Aspergillus flavus*	*Aspergillus fumigatus*	*Penicillium cyclopium*	*Penicillium roqueforti*	Bactérie : *Erwinia herbicola*
Bjerkandera adusta	(+)I	(+)rr	++	(+)I	(+)i	++	(+)i	(+)R	(+)R	+	++
Cyathus stercoreus	+	0	++	(+)I	(+)I	+	(+)r	(+)r	(+)r	(+)R	++
Dichomitus squalens	++	(+)rr	++	++	++	+	⊕	(+)R	(+)r	+	+
Pycnoporus cinnabarinus	+	(+)r	+	(+)R	(+)I	++	■	■	(+)r	(+)R	(+)R
Sporotrichum pulverulentum	(+)R	(+)rr	+	±	±	++	⊕	(+)r)	(+)r	(+)r	+

Tableau 3B – Aptitude compétitive des espèces ligninolytiques confrontées aux espèces spontanées, à 30°C.
Voir légende du Tableau 3A.

Tableau 3B – Competitive hierarchy among ligninolytic white-rot fungi and various straw-inhabiting fungi, at 30°C.
For explanation, see Table 3A.

Espèces spontanées / ligninolytiques	*Alternaria tenuissima*	*Epicoccum nigrum*	*Geotrichum candidum*	*Mucor circinelloides (griseo-cyanus)*	*Mucor hiemalis*	*Aspergillus candidus*	*Aspergillus flavus*	*Aspergillus fumigatus*	*Penicillium cyclopium*	*Penicillium roqueforti*	Bactérie : *Erwinia herbicola*
Dichomitus squalens	(+)R	(+)r	++	(+)R	+	+	(+)ii	(+)r	(+)R	(+)R	++
Pycnoporus cinnabarinus	++	(+)r	++	(+)R	(+)I	++	⊕	(+)r	(+)R	(+)R	++
Sporotrichum pulverulentum	++	(+)rr	(+)R	(+)R	(+)I	++	⊕	(+)rr	(+)rr	(+)r	+

Tableau 3C — Aptitude compétitive des espèces ligninolytiques confrontées aux espèces spontanées, à 35°C.
Ensemencements préalables des espèces spontanées (2 jours à 25°C). Voir Légende du tableau 3A).

Table 3C — Competitive hierarchy among ligninolytic white-rot fungi and various straw-inhabiting fungi, at 35°C.
Straw-inhabiting fungi were inoculated at 25°C, 2 days before the white-rot fungi. For explanation, see Table 3A.

Le troisième essai (Tab. 3C) est alors envisagé à 35°C, température très favorable à 3 espèces basidiomycètes : *Dichomitus squalens*, *Pycnoporus cinnabarinus* et *Sporotrichum pulverulentum*, alors capables d'accroître leur aptitude compétitive. Inversement, des espèces spontanées verront leur croissance s'amenuiser (*A. tenuissima*, *E. nigrum* et *M. circinelloides*) ou s'annuler même (*M. hiemalis*, *P. cyclopium* et *P. roqueforti*).

En conséquence, pour la validité des confrontations, il a été procédé à l'ensemencement préalable des espèces spontanées, à 25°C et pendant 48 h, de sorte que les thalles suffisamment développés ont pu être réellement confrontés avec ceux de basidiomycètes croissant à 35°C; de plus, ces modalités simulent la compétition *in vivo*, sur pailles pré-infectées par les espèces spontanées. Dans ces conditions :

— *Dichomitus squalens* recouvre partiellement *E. nigrum* et *A. fumigatus*; par contre, l'intrication des thalles reste très limitée dans la confrontation avec *A. flavus* dont l'optimum de croissance est très comparable.

— *Pycnoporus cinnabarinus*, près de son optimum, recouvre partiellement *A. fumigatus* (dont le maximum de croissance se situerait à 37°C) mais il ne peut contenir *A. flavus* qui, après un certain temps d'affrontement, l'emporte par recouvrement et lyse.

— *Sporotrichum pulverulentum* reste très peu agressif vis-à-vis d'*E. nigrum* et de *P. cyclopium* pré-installé mais stabilisé par excès thermique tandis que *A. flavus* et, à un degré moindre, *A. fumigatus*, restent les compétiteurs les plus actifs en raison de leur thermopréférence corrélative d'une grande luxuriance.

2 – SIMULATION DU PROCÉDÉ DE «DÉLIGNIFICATION» : ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

+ Essais préalables

Les résultats portés au tableau 4 définissent la dynamique de la flore en conditions déterminées de substrat et de température, pour un échantillon des plus typiques (PELHATE & AGOSIN, 1985). La répartition classique de la flore en trois catégories écologiques se trouve, ici, confirmée.

La flore du champ, soit essentiellement : *A. tenuissima*, *E. nigrum*, et *F. culmorum*, accusent une régression d'autant plus rapide à 37°C mais peu influencée par la teneur en eau du substrat (toujours élevée); on met alors en cause la lyse des thalles – fragmentés et fragiles – par des éléments prépondérants (bactéries, levures et champignons divers).

La flore intermédiaire réagit diversement. *C. cladosporioides*, si abondant sur le témoin, se maintient après incubation; sans doute, faut-il invoquer la brusque sporulation des thalles pré-installés et la relative résistance des spores (fortement pigmentées), dans le temps limité de l'essai; on sait que l'espèce est plutôt considérée comme éphémère en cas de dynamique accélérée. *Mucor hiemalis* est en augmentation croissante avec la teneur en matière sèche et aussi la température, ce qui peut surprendre *a priori*, compte tenu du caractère mésophile de l'espèce. Les levures sont si largement dominantes – avec les bactéries – qu'elles ne répondent plus aux gradients hydriques et thermiques; il est vrai que *Sporobolomyces roseus*, très largement représenté sur les matériels végétaux au moment de la récolte, résiste particulièrement aux températures élevées (MALONE & MUSKETT, 1964).

La flore de stockage comporte *P. cyclopium*, espèce mésophile et, de ce fait, inattendue, mais dont l'essor reste probablement momentané : le développement d'*A. flavus* et *A. fumigatus*, mieux justifié, sera soutenu et d'autant plus accentué à 37°C, température voisine de l'optimum de croissance.

Ainsi, l'environnement très favorable, tant par l'humidité que par la température, assure une dynamique accélérée de la flore avec : régression des espèces du champ plutôt mycéliennes, comportement varié de la flore intermédiaire (capable de brusque sporulation) et développement actif d'espèces de stockage présentant la double affinité hydrique et thermique, en équilibre avec les bactéries. Il est vrai que ce cortège de transition, observé après une aussi brève incubation (5 jours), va rapidement évoluer au profit d'agents thermopréférants. En d'autres termes, et si l'on doit transposer à l'échelle pratique, cette dynamique va précipiter l'«échauffement» du stock.

+ Cultures mixtes : incubation de pailles surinfectées

L'inoculation de pailles spontanément polluées, sans autres précautions, par une espèce ligninolytique donnée, va modifier le cortège floristique initial et il importera alors de suivre l'éventuelle déviation de la dynamique globale. Les

Espèces — température / M.S.	Pailles incubées 30°C 25 %	Pailles incubées 30°C 40 %	Pailles incubées 37°C 25 %	Pailles incubées 37°C 40 %	Témoin sec # 90 %
FLORE DU CHAMP					
Acremonium strictum	?				150M
Alternaria tenuissima (+ *A. alternata*)	7,5M	6M	"		25M
Epicoccum nigrum	500	750	"		1,6M
Fusarium culmorum	1,2M	2,5M	"	"	800
Fusarium poae	"	150	?		"
FLORE INTERMEDIAIRE					
Cladosporium cladosporioides (+ *C. herbarum*)	4,5M	5M	2,5M	7,5M	800M
Gonatobotrys simplex					150
Harzia acremonioides					50
Mucor hiemalis	200	500	250	4M	"
Verticillium lecanii					+
LEVURES :					
Rhodotorula sp.) *Sporobolomyces* sp.)	750MM	800MM	850MM	850MM	+
Candida sp.	"	"	+	+	+
FLORE DE STOCKAGE					
Aspergillus flavus	"	?	1,5M	"	"
Aspergillus fumigatus	?	?	"	3M	?
Aspergillus gr. *glaucus*					150
Aspergillus ochraceus				"	"
Aspergillus versicolor					"
Penicillium cyclopium	250	1,5M	18M	12M	"
Penicillium pulvillorum					"
BACTERIES (aérobies totales)	220MM	700MM	850MM	1,2MMM	40MM
dont Actinomycètes			"	?	?

? présence vraisemblable ; " traces ; M = 1.000 ; MM = 1.000.000 ; MMM = 1.000.000.000

Tableau 4 — Comportement de la flore spontanée sur pailles incubées.
Les pailles broyées, humidifiées à deux taux (teneurs respectives en M.S. : 25 et 40 %), sont incubées pendant 5 jours à 30 ou 37 °C.
Contrôles qualitatif et quantitatif (nombre de germes/g).

Table 4 — Evolution of natural microflora of wheat straw.
The population was estimated after 5 days incubation (30 or 37 °C and 25 or 40 % dry matter) by plating out particles on malt agar and by the dilution plate technique.
Qualitative and quantitative (germ counts/g) detection.

espèces ligninolytiques les plus intéressantes du point de vue technologique et/ou plus compétitives en essais de confrontation, seront considérées.

– Inoculation directe de *Pycnoporus cinnabarinus*

En dépit des variantes de conditionnement : teneurs du substrat en M.S. (20 et 30 %), températures (30 et 70°C), pression partielle d'oxygène (air et 100 % oxygène respectivement), l'essai devait se solder par un échec avec, d'une part : inhibition totale de l'inoculum basidiomycète et, d'autre part : explosion d'espèces spontanées dominantes, au même titre que sur le témoin non inoculé et ce, en toutes conditions expérimentales. C'était, ainsi, consacrer la dominance peu maîtrisable observée dans l'essai préalable et notamment, celle des mucorales et des bactéries.

Cette technique d'ensemencement direct s'étant révélée inefficace au cours des essais préliminaires avec *Cyathus stercoreus* et *Dichomitus squalens* a donc été abandonnée.

– Inoculation, en deux temps, de *Bjerkandera adusta*

Le protocole expérimental est notoirement amélioré par addition, au substrat, d'un inoculum pré-installé sur paille broyée. Le contrôle de la flore totale, mixte, après 8 jours d'incubation, conduit aux résultats mentionnés au tableau 5.

Teneur du substrat en M.S.	20 %			30 %			40 %		
Températures d'incubation	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C
Espèces inventoriées									
Bjerkandera adusta	?	?	?		■		550	?	?
Aspergillus fumigatus			600M				"		15M
Aspergillus niger									4M
Epicoccum nigrum	1,5M	"		15M	■		150		
Mucor hiemalis	850M	550M	25M	650M	80M	750M	1,5M	50M	■
Penicillium oxalicum							120M		1,5M
Penicillium stoloniferum	"								
Rhizopus stolonifer									"
Trichoderma sp.									150
Bactéries (aérobies totales)	1,2 MMM	480 MMM	6 [redacted]	4,5 MMM	2,5 MMM	800 MMM	25 MM	8 MMM	1,5 MMM

? présence vraisemblable ; " traces ; M = 1.000 ; MM = 1.000.000 ; MMM = 1.000.000.000

Tab. 5 – Flore mixte sur paille inoculée (en deux temps) avec *Bjerkandera adusta*.
Influence de la teneur en M.S. du substrat et de la température sur l'installation compétitive de l'espèce introduite. Nombre moyen de germes/g de produit incubé.

Table 5 – Mixed flora on straw inoculated (two times) with *Bjerkandera adusta*.
Effect of dry matter content and temperature on the competitive colonization by the white-rot fungus. Average counts/g of incubated product.

Tout en retrouvant la même prépondérance des mucorales et des bactéries, on notera, du moins dans l'une des conditions (M.S. 40 %; 25°C), la présence du basidiomycète inoculé. C'est un premier point acquis mais avec la réserve que

les dominantes habituelles s'adjoignent le *P. oxalicum* incompatible avec une transposition pratique du procédé, d'autant que l'optimum thermique de cette espèce coïncide sensiblement avec celui de *Bjerkandera adusta* (soit environ 30°C).

— Inoculation, en deux temps, de *Cyathus stercoreus*

L'essai réalisé selon le protocole précédent conduit aux résultats transposés au tableau 6.

Teneur du substrat en M.S.	20 %			30 %			40 %		
Températures d'incubation	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C
Espèces inventoriées									
Cyathus stercoreus	150	400	?	"	250	?	500	2,5M	?
Alternaria sp.							"		
Aspergillus fumigatus			150M						25MM
Aspergillus flavus								■	
Epicoccum nigrum	1,2M			450			4,5M		
Mucor hiemalis	750M	120M	80M	300M	400M	15M	850M	30M	"
Trichoderma sp.						500			
Bactéries (aérobies totales)	60MM	150M	70MM	90MM	350 MM	800 MM	250MM	12MM	1,2 MMM

? présence vraisemblable ; " traces ; M = 1.000 ; MM = 1.000.000 ; MMM = 1.000.000.000

Tableau 6 — Flore mixte sur paille inoculée (en deux temps) avec *Cyathus stercoreus*.
Voir légende du Tableau 5.

Table 6 — Mixed flora on straw inoculated (two times) with *Cyathus stercoreus*.
See notice of Table 5.

L'analyse floristique se révèle plus prometteuse dans la mesure où le basidiomycète inoculé ■ retrouve en diverses conditions, soit aux températures de 25 et 30°C à l'exclusion de 37°C. Le meilleur développement est obtenu pour 40 % M.S. et 30°C soit en conformité avec les données écologiques antérieurement acquises : température (Fig. 3) ou aptitude compétitive sur chaumes (Tab. 3A, 3B).

— Inoculation, en deux temps, de *Dichomitus squalens* et *Sporotrichum pulverulentum* (respectivement)

Le protocole précédent est utilisé; pourtant, la première espèce ne peut s'implanter en aucune condition.

La seconde espèce, *Sporotrichum pulverulentum*, s'impose, au contraire, de façon spectaculaire mais précisément à 37°C et indépendamment des teneurs du substrat en eau. Ces résultats (Tab. 7) se comprennent à la fois par le caractère thermopréférant mais aussi par la densité de sporulation très particulière à l'espèce et qui conduit à la surestimation par contrôle numérique; dans ce

Teneur du substrat en M.S.	20 %			30 %			40 %		
Températures d'incubation	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C
Espèces inventoriées									
Sporotrichum pulverulentum	?	?	16MM	?	?	180M	?	?	120M
Aspergillus gr. *glaucus* (*amstelodami*)						"			
Epicoccum nigrum	15M	15MMM	4M	850M	2,5MM	15M	2,4MM	120MM	"
Penicillium roqueforti						50M			35M
Levures (*Candida* sp.)			25M						
Bactéries (aérobies totales)	900MM	750MM	150M	1,2MMM	1,5MMM	250MM	2,6MMM	3MMM	600MM
Actinomycètes							75MM	45MM	

? présence vraisemblable ; " traces ; M = 1.000 ; MM = 1.000.000 ; MMM = 1.000.000.000

Tableau 7 — Flore mixte sur paille inoculée (en deux temps) avec *Sporotrichum pulverulentum*.
Voir légende du Tableau 5.

Tableau 7 — Mixed flora on straw inoculated (two times) with *Sporotrichum pulverulentum*.
See notice of Table 5.

sens, il convient de reconnaître les limites de la méthode «quantitative» qui, inversement, sous-estimera les implantations d'autres souches et notamment de *Cyathus stercoreus* ne sporulant que faiblement et ne livrant pour «germes» que des fragments mycéliens (CHANG & HUDSON, 1967).

— Inoculation, en deux temps, avec *Bjerkandera adusta* et *Pycnoporus cinnabarinus* (respectivement)

Les précédents aléas expérimentaux feront considérer, ici, l'influence du pH : deux valeurs de pH initial tamponné (5,5 et 6.5) ont été retenues.

Après 8 jours d'incubation, les contrôles qualitatifs de thalles (pour les basidiomycètes) et quantitatifs pour les espèces spontanées sporulées (Tab. 8 et 9) attestent une amélioration, nuancée, il est vrai, par rapport à un essai antérieur (Inoculation par *Bjerkandera adusta*). En la circonstance, l'installation préférentielle du *Bjerkandera adusta* s'effectue à 30°C et à pH 6,5, la teneur en eau étant moins déterminante. Considérant l'ajustement du pH spécifique, aux environs de 5,4 (Tab. 2), on peut s'étonner que les performances du basidiomycètes ne soient pas meilleures sur milieu à pH 5,5; mais il est vrai que, dans les deux conditions optimales, le pH final est de 5,4. Dans ces conditions, la compétition se résout entre trois partenaires majeurs : *Bjerkandera adusta*, mucorales (soit deux *Mucor* essentiels) et bactéries (*Erwinia herbicola* principalement). Plus précisément, les bactéries, à multiplication plus précoce, sont relativement favorisées par le pH 6,5; elles contiennent ainsi les mucorales qui se posent en concurrentes les plus directes du basidiomycète; dès lors, celui-ci l'emporte en limitant, par la suite, l'essor bactérien.

Inversement, à pH 5,5, les mucorales se développent de pair avec les bactéries, en première phase; cette association limite l'essor de l'inoculum basidiomycète qui ne subsistera qu'à l'état de traces.

pH initial pH final	5,5 5,2	 5,3	 5,1	 5,4	6,5 4,5	 5,4	 5,6	 5,4
Teneur du substrat en M.S.	30 %		40 %		30 %		40 %	
Températures d'incubation	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C
Espèces inventoriées								
Bjerkandera adusta	+	"	"	?	?	++	+	+++
Actinomucor elegans	"	1,5M	"	"	5M	12M	"	1,5M
Aspergillus niger								250
Epicoccum nigrum	"				"			
Mucor hiemalis + *M. circinelloides* (*griseo-cyanus*)	525M (h)	750M (cgc)	850M (h)	1,2MM (cgc)	125M (h+cgc)	120M (cgc)	2,5M (cgc)	125M (cgc)
Penicillium cyclopium							"	
Penicillium frequentans			"					
Trichoderma harzianum					2,5M			
Bactéries (aérobies totales)	480M	1,2MMM	500MM	1,5MMM	250M	650M	1,2MMM	850MM
Actinomycètes					+		"	

? présence vraisemblable ; " + ++ +++ : estimation qualitative des thalles
M = 1.000 ; MM = 1.000.000 ; MMM = 1.000.000.000 (observation sur Malt 2 %)
Prépondérance respective de *Mucor hiemalis* (h) et *M. circinelloides* f. *griseo-cyanus* (cgc)

Tableau [redacted] — Flore mixte sur paille inoculée (en deux temps) avec *Bjerkandera adusta*. Influence du substrat (teneur en M.S. et pH tamponné) et de la température. Estimation qualitative de l'espèce inoculée; numération des germes (nombre moyen/g) d'espèces spontanées.

Table 8 — Mixed flora on straw inoculated (two times) with *Bjerkandera adusta*. Effect of dry matter content, buffered pH and temperature. Qualitative detection of the inoculated species; average germ counts of the spontaneous flora.

pH initial pH final	5,5 4,7	 5,0	 4,9	 5,3	6,5 5,7	 6,3	 6,2	 5,9
Teneur du substrat en M.S.	30 %		40 %		30 %		40 %	
Températures d'incubation	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
Espèces inventoriées								
Pycnoporus cinnabarinus	+	+++	+	+	+	"	"	++
Actinomucor elegans (+*Rhizomucor pusillus*)	120M	15M	85M	55M	5M	"	25M	20M
Aspergillus flavus						35M		
Aspergillus fumigatus						450M		250M
Aspergillus niger						"		
Aspergillus ochraceus								"
Mucor hiemalis + *M. circinelloides* (*griseo-cyanus*)	750 (h)	" (cgc)	1,5M (h)	1,2M (cgc)	250M (h+cgc)	15M (cgc)	40M (cgc)	7,5M (cgc)
Penicillium waksmani	60M	"	25M	45M	"	1,2M	?	120M
Trichoderma harzianum				250				
Levures (*Rhodotorula rubra*)	"	"			10M	"		
Bactéries (aérobies totales)	120M	25M	35MM	75MM	110MM	850MM	750MM	1,2MMM

? présence vraisemblable ; " + ++ +++ : estimation qualitative des thalles
M = 1.000 ; MM = 1.000.000 ; MMM = 1.000.000.000 (observation sur Malt 2 %)
Prépondérance respective de *Mucor hiemalis* (h) et *M. circinelloides* f. *griseo-cyanus* (cgc)

Tableau 9 — Flore mixte sur paille inoculée (en deux temps) avec *Pycnoporus cinnabarinus*. Voir légende du Tableau 8.

Table 9 — Mixed flora on straw inoculated (two times) with *Pycnoporus cinnabarinus*. See notice of Table 8.

En ce qui concerne *Pycnoporus cinnabarinus* (Tab. 9), l'implantation est générale tout en étant très inégale et réellement importante en 2 cas : toujours à 37°C mais indifféremment aux pH (5,5 ou 6,5) et aux teneurs en eau du substrat (30 ou 40 %). L'optimum thermique de l'espèce (Fig. 3 B) représente l'atout le plus déterminant vis-à-vis des mucorales. Mais ces succès de première phase restent aléatoires en considération du risque consécutif à la prolifération d'espèces de «stockage» plus nettement thermopréférantes telles que *A. flavus*, *A. fumigatus*... et qui induiront un échauffement poussé, fatal pour *Pycnoporus cinnabarinus*. Le premier échec enregistré (Inoculation par *Pycnoporus cinnabarinus*) était ainsi expliqué, en conformité d'ailleurs avec les aptitudes compétitives observées sur chaumes (Tab. 3C).

– Inoculation, en deux temps, avec *Dichomitus squalens* et *Cyathus stercoreus* (respectivement)

Le protocole expérimental précédent, à 3 variables, est repris.

Les résultats obtenus avec la première espèce confirment la déception évoquée antérieurement (inoculation de l'espèce en 3 conditions de substrat (20, 30 et 40 % de M.S.) et 3 conditions de température (25, 30 et 37°C); *Dichomitus squalens* n'est révélé ici, à l'isolement direct sur particules de pailles, que dans les 3 cas suivants : pH 5,5/M.S. 30 %/ à deux températures (30 et 37°C); pH 6,5/ M.S. 40 % / à 37°C).

pH initial	5,5				6,5			
pH final	5,4	5,8	5,6	5,9	5,8	6,2	5,9	6,0
Teneur du substrat en M.S.	30 %		40 %		30 %		40 %	
Températures d'incubation	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	35°C
Espèces inventoriées								
Cyathus stercoreus	+++	+++	+	++	++	+++	++	++
Actinomucor elegans (+*Rhizomucor pusillus*)	5M	1,5M	25M	350M	400M	275M	125M	150M
Aspergillus fumigatus					■			
Aspergillus gr. *glaucus*				"				
Aspergillus niger	"							
Fusarium sp.			"					
Mucor hiemalis	125MM	140M	500M	120M	15M	45M	175M	120M
Penicillium steckii	"	4M		120M		5M		
Rhizopus stolonifer				"				
Trichoderma harzianum			5M					"
Bactéries (aérobies tota- (*Erwinia herbicola* + ...)	15MM	25MM	6MM	250M	24MM	80MM	350M	1,5MM

? présence vraisemblable ; " + ++ +++ : estimation qualitative des thalles
M = 1.000 ; MM = 1.000.000 (observation sur Malt 2 %)

Tableau 10 – Flore mixte sur paille inoculée (en deux temps) avec *Cyathus stercoreus*. Voir légende du Tableau 8.

Table 10 – Mixed flora on straw inoculated (two times) with *Cyathus stercoreus*. See notice of Table 8.

Seule la température serait donc déterminante de son essor : mais, au caractère thermopréférant (Tab. 3A), s'associe le risque d'espèces spontanées plus tolérantes encore (FERGUS. 1964) et fortement compétitives telles que *Aspergillus* spp., *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces variotii* ... Le dénouement de la compétition est donc incertain.

La deuxième espèce, *Cyathus stercoreus* (Tab. 10) est révélée régulièrement, au contraire, avec une meilleure implantation en conditions relativement peu précises de pH initial (5,5 ou 6,5), de température (25 ou 35°C), de M.S. du substrat (30 %). Ces résultats confirment les données enregistrées antérieurement (Inoculation directe par *Cyathus stercoreus*) mais sans préciser davantage le déterminisme factoriel optimal. C'est dire que les aléas de la compétition subsistent. Et, dans le cas présent, les bactéries seraient les antagonistes les plus précoces, susceptibles d'influencer la dynamique du cortège floristique mixte; en limitant notamment les mucorales au thalle luxuriant et extensif, elles favoriseraient indirectement l'espèce inoculée. Pourtant, le risque *a posteriori* subsiste de par la présence d'une espèce de stockage (*P. steckii*) régulièrement présente. On voit ainsi les interactions mutuelles d'espèces et les inévitables déplacements d'équilibres biologiques fréquemment observés (BURGESS & GRIFFIN, 1967).

CONCLUSION

Les comportements écologiques respectifs de la flore spontanée des pailles et des basidiomycètes ligninolytiques retenus n'apparaissent pas suffisamment différenciés pour escompter une dissociation sélective des deux entités et, qui plus est, l'élimination des espèces pré-installées indésirables par le seul effet de l'antagonisme.

Plus précisément, la gamme des espèces spontanées et potentiellement compétitives entraîne une grande amplitude écologique globale si bien que lorsque les conditions expérimentales varient, il est toujours un (ou plusieurs) intervenant(s) qui s'adapte(nt) au créneau défini en vue de favoriser l'inoculum.

Sans doute, les essais de simulation du procédé d'incubation sont-ils plus prometteurs lorsque l'inoculum préalablement développé sur un substrat identique (paille broyée humidifiée) est massivement rapporté et régulièrement incorporé au stock (inoculation en deux temps). Mais il reste que des espèces spontanées peuvent présenter une compétitivité intrinsèque difficile à surmonter; tels sont notamment les *Aspergillus* spp. thermopréférants et, à ce titre très luxuriants, attendu que le stock est toujours voué à l'échauffement plus ou moins rapide.

Ces faits suscitent donc l'alternative et/ou la complémentarité suivante(s) :

- Prétraitement des pailles spontanées polluées en vue d'inhiber ou de réduire l'activité de la flore pré-installée; et l'on pense alors à une éventuelle «pasteurisation» comme elle a pu être envisagée pour une humification dirigée des

composts (RENOUX-BLONDEAU, 1959) ou la neutralisation de parasites inféodés aux pailles enfouies dans le sol (COOK & BRUEHL, 1968).

– Renforcer l'inoculum basidiomycète devant surpasser le «premier occupant» et ce, en contradiction avec la loi écologique si généralement admise; on peut alors suggérer l'inoculation – simultanée ou non – de plusieurs espèces qui, à l'instar de la flore spontanée, verraient leur amplitude écologique accrue.

– Favoriser électivement l'essor du (ou des) basidiomycètes(s) inoculé(s) en modifiant le substrat initial par d'éventuels additifs qui modifieraient en particulier les sources de carbone et/ou d'azote, ou en choisissant des pH initiaux plus adéquats.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude à la Société Sanofi Santé Animale pour l'aide matérielle qu'elle nous a octroyée pour la réalisation de la présente étude.

BIBLIOGRAPHIE

AGOSIN E. and ODIER E., 1985 – Solid-state fermentation, lignin degradation and in vitro digestibility of wheat straw fermented with selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21 : 397-403.

AGOSIN E., DAUDIN J.J. and ODIER E., 1985a – Screening of white-rot fungi on (^{14}C) lignin-labelled wheat straw and (^{14}C) whole-labelled wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (sous presse).

AGOSIN E., MONTIES B. and ODIER E., 1985b – Structural changes of wheat straw components during decay by lignin-degrading white-rot fungi in relation to improvement of digestibility for ruminants. *J. Sci. Food Agric.* (sous presse).

AINSWORTH G.C., SPARROW F.K. and SUSSMAN A.S., 1973 – *The fungi, an advanced treatise.* N. Y. & London, Academic Press, IV B, 504 p.

ANDER P. and ERIKSSON K.E., 1977 – Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Physiol. Pl.* 41 : 239-248.

APINIS A., 1971 – Thermophilous fungi of certain grasslands. Proc. 1st. Int. Congress Mycol. (Exeter), Abstract IV 4 : 5.

ARX J.A. von, 1974 – *The genera of fungi sporulating in pure culture.* Ed. 2, Lehre, J. Cramer, 315 p.

BAR-LEV S.S. and KIRK T.K., 1981 – Effect of molecular oxygen on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 : 373-378.

BELL M.K., 1974 – Decomposition of herbaceous litter. *In* : C.H. DICKINSON & G.H. PUGH. *Biology of plant litter decomposition,* N. Y. & London, Academic Press I : 37-67.

BODDY L., 1983 – Effect of temperature and water potential on growth rate of wood-rotting basidiomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 80 : 141-149.

BURGESS L.W. and GRIFFIN D.M., 1967 – Competitive saprophytic colonization of

wheat straw. *Ann. Appl. Biol.* 60 : 137-142.

BURSDALL H.H. and ESLYN N.E., 1974 – A new *Phanerochaete* with a *Chrysosporium* imperfect state. *Mycotaxon* 1 : 123-133.

CHANG Y. and HUDSON H.J., 1967 – The fungi of wheat straw compost. I. Ecological studies. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 50 : 649-666.

COOK R.J. and BRUEHL G.W., 1968 – Relative significance of parasitism versus saprophytism in colonization of wheat straw by *Fusarium roseum «culmorum»* in the field. *Phytopathology* 58 : 306-308.

COONEY D.G. and EMERSON R., 1964 – *Thermophilic fungi.* San Francisco, W.H. FREEMAN Pub. co, 188 p.

FAHN L.T., LEE Y.H. and GHARPURAY M.M., 1982 – The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances Biochem. Engin.* 23 : 157-187.

FERGUS C.L., 1964 – Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. *Mycologia* 56 : 267-284.

GARRET S.D., 1975 – Cellulolysis rate and competitive saprophytic colonization of wheat straw by foot-rot fungi. *Soil Biol. Biochem.* 7 : 323-327.

GORDON A.H. and CHESSON A., 1983 - The effect of prolonged storage on the digestibility and nitrogen content of ammonia-treated barley straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* [redacted] : 147-153.

JACKSSON M.G., 1977 – Review article : the alkali treatment of straws. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1 : 105-130.

KIRK T.K. and MORE W.E., 1972 - Removing lignin from wood with white-rot fungi and digestibility of resulting wood. *Wood & Fiber* 4 : 72-79.

KIRK T.K., SCHULTZ E., CONNORS W.J., LORENZ L.F. and ZEIKUS J.G., 1978 – Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium. Arch. Mikrobiol.* 117 : 277-285.

MALONE J.P. and MUSKETT A.E., 1964 – Seed-borne fungi. *Proc. ISTA* 29 : 177-384.

PANASENKO V.T., 1967 – Ecology of microfungi. *Bot. Rev.* (Lancaster) 33 : 189-215.

PELHATE J., 1968a – Étude expérimentale des interactions de moisissures caractéristiques des grains. *Rev. Mycol.* 33 : 43-70.

PELHATE J., 1968b – Recherche des besoins en eau chez quelques moisissures des grains. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 36 : 117-128.

PELHATE J., 1974 – Maladies des grains stockés (blé-orge). Compt. Rend. 4ème J. Phytiatrie Phytopharm. (Montpellier) : 236-256.

PELHATE J. et AGOSIN E., 1985 – Mycoflore spontanée des pailles de blé. *Cryptogamie, Mycol.* 6 : 1-19.

PUGH G.J.F., 1974 – Terrestrial fungi. *In* : C.H. DICKINSON & G.J. PUGH. *Biology of plant litter decomposition,* N.Y. & London, Academic Press, II : 303-306.

READE A.E. and Mc QUEEN R.E., 1983 - Investigation of white-rot fungi for the conversion of poplar into a potential feedstuff for ruminants. *Canad. J. Microbiol.* 29 : 457-463.

RENOUX-BLONDEAU H., 1959 – Étude de certains Actinomycètes se développant au cours de la «pasteurisation» du fumier. Leur action sur le développement ultérieur du champignon de couche. *Mushroom Science* 4 : 153-175.

TEMPE J. de and LIMONARD T., 1973 - Seed fungal-bacterial interactions. *Seed Sci. Technol.* 1 : 203-216.

WICKLOW D.T. and HIRSCHFIELD B.J., 1979 — Evidence of a competitive hierarchy among coprophilous fungal populations. *Canad. J. Microbiol.* 25 : 855-858.

WICKLOW D.T., DETROY R.W. and JESSEE B.A., 1980 — Decomposition of lignocellulose by *Cyathus stercoreus* (Schw.) de Toni NRRL 6473, a «white-rot» fungus isolated from cattle dung. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 : 169-170.

ZADRAZIL F., 1980 — Conversion of different plant waste into feed by Basidiomycetes. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9 : 243-248.

ZADRAZIL F. and BRUNNERT H., 1981 — Investigation of physical parameters important for the solid-state fermentation of straw by white-rot fungi. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11 : 183-188.

ZADRAZIL F. and BRUNNERT H., 1982 — Solid state fermentation of lignocelluloses containing plant residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens* (Karst.) Reid. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16 : 45-51.

ZADRAZIL F., GRINBERG S.J. and GONZALEZ A., 1982 — «Palo podrido»-decomposed wood used as feed. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15 : 167-171.